

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГАМК НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНАХ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИММУНОПАТОЛОГИИ

М. А. Самотруева¹, М. М. Магомедов¹, Е. Б. Хлебцова¹, И. Н. Тюренков²

На крысах линии Вистар с циклофосамидной (ЦФА) иммунодепрессией и липополисахаридным (ЛПС) иммунным стрессом изучали влияние производных ГАМК — фенотропила (25 мг/кг), фенибутта (25 мг/кг) и баклофена (2 мг/кг) на процессы перекисного окисления липидов (исходный уровень малонового диальдегида, скорости спонтанного и аскорбатзависимого ПОЛ) и активность каталазы в гомогенатах тимуса и селезенки. При воздействии ЦФА и ЛПС в иммунных органах происходит активация процессов липопероксидации. У животных, подверженных воздействию ЛПС, в селезенке наблюдалось увеличение активности каталазы, в тимусе, наоборот, снижение; под влиянием ЦФА происходило угнетение данного фермента. Анализ антиоксидантной активности производных ГАМК при ЦФА иммунодепрессии показал, что все вещества при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней способствовали устранению нарушений, подавляя процессы липопероксидации и повышая активность антиоксидантной защиты. На фоне ЛПС иммунного стресса все вещества проявили корригирующее действие в отношении указанных биохимических процессов в тимусе, в то время как антиокислительную систему в селезенке активировал лишь фенибут.

Ключевые слова: фенотропил, фенибут, баклофен, перекисное окисление липидов и активность каталазы в тимусе и селезенке, иммунодепрессия, иммунный стресс

ВВЕДЕНИЕ

Исключительное значение для процессов сохранения гомеостаза имеют два полифункциональных блока, выполняющих функцию защиты организма от действия повреждающих факторов: иммунная и антиоксидантная системы [3, 11]. Как известно, все процессы, обеспечивающие защиту организма от патогенных факторов (вирусов, бактерий, паразитов, стареющих, злокачественных и др. клеток) разделяются на две группы: непосредственно механизмы иммунной системы, осуществляющие функцию специфического “реагирования” на антигенное воздействие и неспецифическую резистентность, включающую фагоцитарные реакции клеток крови и тканей, а также определенный уровень антиоксидантной защиты [2]. Значение неспецифической резистентности состоит в том, что с помощью медиаторов иммунной системы в процесс вовлекаются мощные воспалительные реакции, включая активацию и привлечение макрофагов, нейтрофилов и других типов клеток [4]. В последние десятилетия исследователи стали уделять внимание изучению возможных механизмов взаимодействия между иммунной и антиоксидантной системами организма. Показано, что именно цитокины являются одними из индукторов синтеза антиоксидантных ферментов, повышая при этом общую антиокислительную активность [1]. В других работах, напротив, показано, что цитокины, взаимодействуя с клетками фагоцитарного ряда, активируют их и за счет

возрастания продукции радикалов-инициаторов, могут повышать прооксидантный потенциал клеток [10]. Принимая во внимание тот факт, что в настоящее время насчитывается значительное число цитокинов, становится очевидной важная регулирующая роль этих иммуномедиаторов, посредством которых и реализуется взаимообусловленное функционирование иммунной и антиоксидантной систем организма. Нельзя исключать и значение в процессах интеграции деятельности указанных выше систем нейромедиаторов, спектр биологической активности которых характеризуется многопрофильностью [7]. Так, ГАМК и её аналоги вызывают интерес исследователей благодаря широкому спектру фармакологических свойств: нейро-, психо-, иммуностропных и др. [12, 13]. В ранее представленных работах мы продемонстрировали выраженную иммуностропную активность фенибутта, фенотропила, баклофена и их новых аналогов. Установлено, что вещества способны устранять нарушения специфического (гуморального и клеточного) и неспецифического звеньев иммуногенеза, развивающиеся в условиях экспериментальной иммунопатологии [6, 8, 14]. Однако оценка состояния антиокислительной системы в иммунокомпетентных органах под влиянием производных ГАМК не проводилась.

Целью данной работы было изучение влияния производных ГАМК — фенибутта, фенотропила и баклофена — на интенсивность ПОЛ и активность каталазы в органах иммунной системы (тимус, селезенка) в условиях экспериментальной иммунопатологии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 80 крысах-самцах линии Вистар 6–7-месячного возраста. В ходе исследования было поставлено 2 серии опытов: в 1-ой — проводили изучение активности производных ГАМК на модели цик-

¹ Кафедра фармакогнозии с курсом фармацевтической технологии и биотехнологии (зав. — Е. Б. Хлебцова), ГОУ ВПО “Астраханская государственная медицинская академия Росздрава”, 414000, Астрахань, ул. Бакинская, 121.

² Кафедра фармакологии и биофармации ФУВ (зав. — проф. И. Н. Тюренков), ГОУ ВПО “Волгоградский государственный медицинский университет Росздрава”, Волгоград.

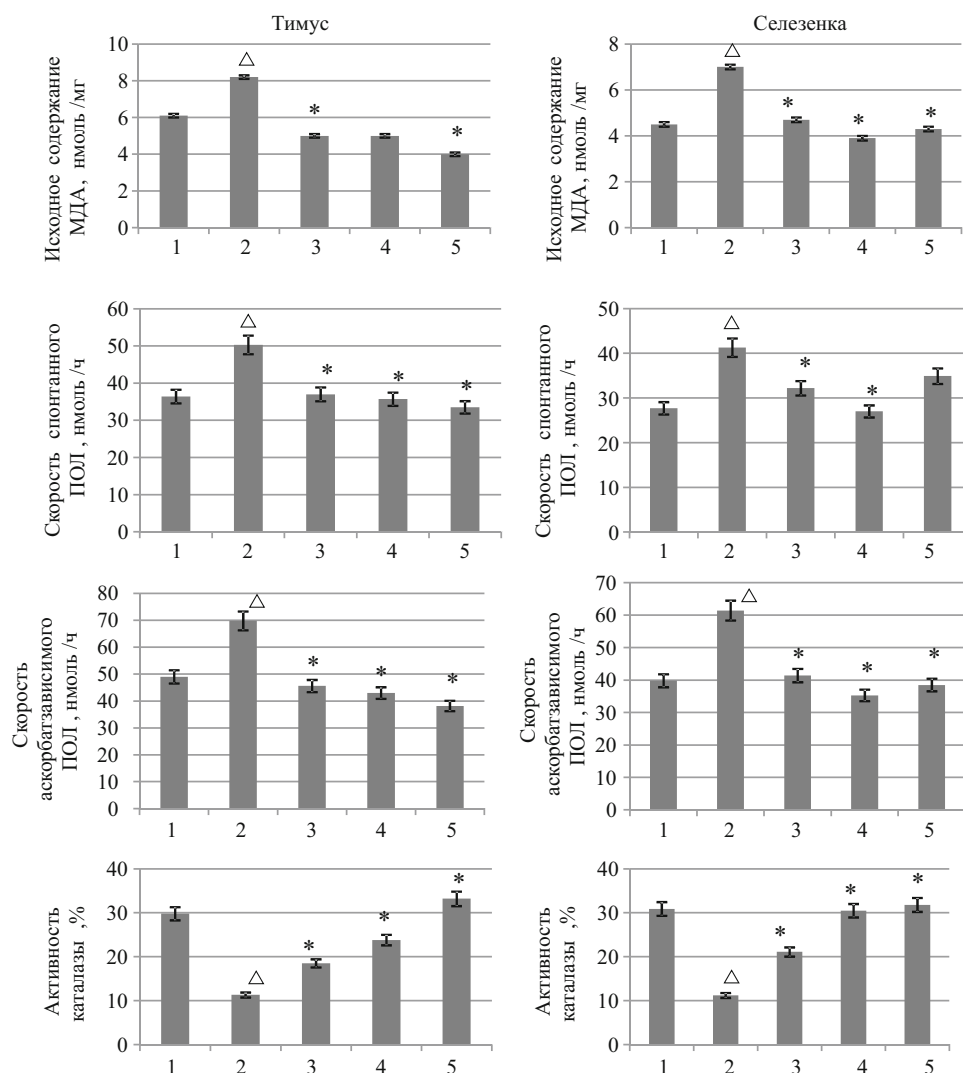


Рис. 1. Влияние фенибута, фенотропила и баклофена на процессы ПОЛ и активность каталазы в тимусе и селезенке при ЦФА-индуцированной иммунодепрессии.

1 — Контроль 1 (физр-р); 2 — контроль 2 (ЦФА); 3 — фенибут (25 мг/кг) + ЦФА; 4 — фенотропил (25 мг/кг) + ЦФА; 5 — баклофен (2 мг/кг) + ЦФА. Здесь и на рис. 2: МДА — малоновый диальдегид, ПОЛ — перекисное окисление липидов.

△ — $p < 0,05$ и * — $p < 0,05$ — степень достоверности относительно контроля 1 и контроля 2 соответственно.

лофосамидной иммунодепрессии (циклофосамид, ЦФА), 125 мг/кг, однократно, внутривенно); во 2-ой — на модели острого иммунного стресса (липолисахарид, ЛПС, 100 мкг/кг, однократно, внутривенно). В каждой серии животные были разделены на группы ($n = 8$): контроль 1 (физиологический раствор), контроль 2 (модель иммунопатологии) и опытные группы, в которых животные на фоне иммунопатологии получали производные ГАМК — фенотропил (25 мг/кг), фенибут (25 мг/кг), баклофен (2 мг/кг), внутривенно 1 раз в сутки в течение 5-ти дней. Изучаемые вещества начинали вводить за 2-е суток до индукции иммунных нарушений. Выведение животных из эксперимента осуществляли через сутки после последнего введения производных ГАМК.

В гомогенате тимуса и селезенки определяли исходный уровень малонового диальдегида (МДА) и скорость спонтанного и индуцированного ПОЛ [9]. Основой метода является определение МДА, который при взаимодей-

ствии с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) образует окрашенный в розовый цвет триметиновый комплекс. Навеску ткани массой 250 мг растирали в сухой охлажденной ступке, далее гомогенизировали в 10 мл охлажденного 1,2 % раствора КСl. Полученный гомогенат (по 2 мл) разливали в три пробирки. Затем в первую пробирку с помощью дозатора добавляли 0,2 мл дистиллированной воды; во вторую пробирку — 0,1 мл раствора аскорбиновой кислоты и 0,1 мл раствора соли Мора (4×10^{-5} М); в третью пробирку — 0,2 мл дистиллированной воды и 1 мл 40 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробирки помещали на 10 мин в водяную баню при 37 °С, после чего в первые две пробирки добавляли по 1 мл раствора ТХУ. Далее пробы центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, после чего отбирали по 2 мл надосадочной жидкости, к которой добавляли по 1 мл 0,8 % раствора ТБК и помещали пробы в кипящую водяную баню на 10 мин. Показатели измеряли на спектрофотометре SP-ULTRA (OLVEX, Россия) при длине

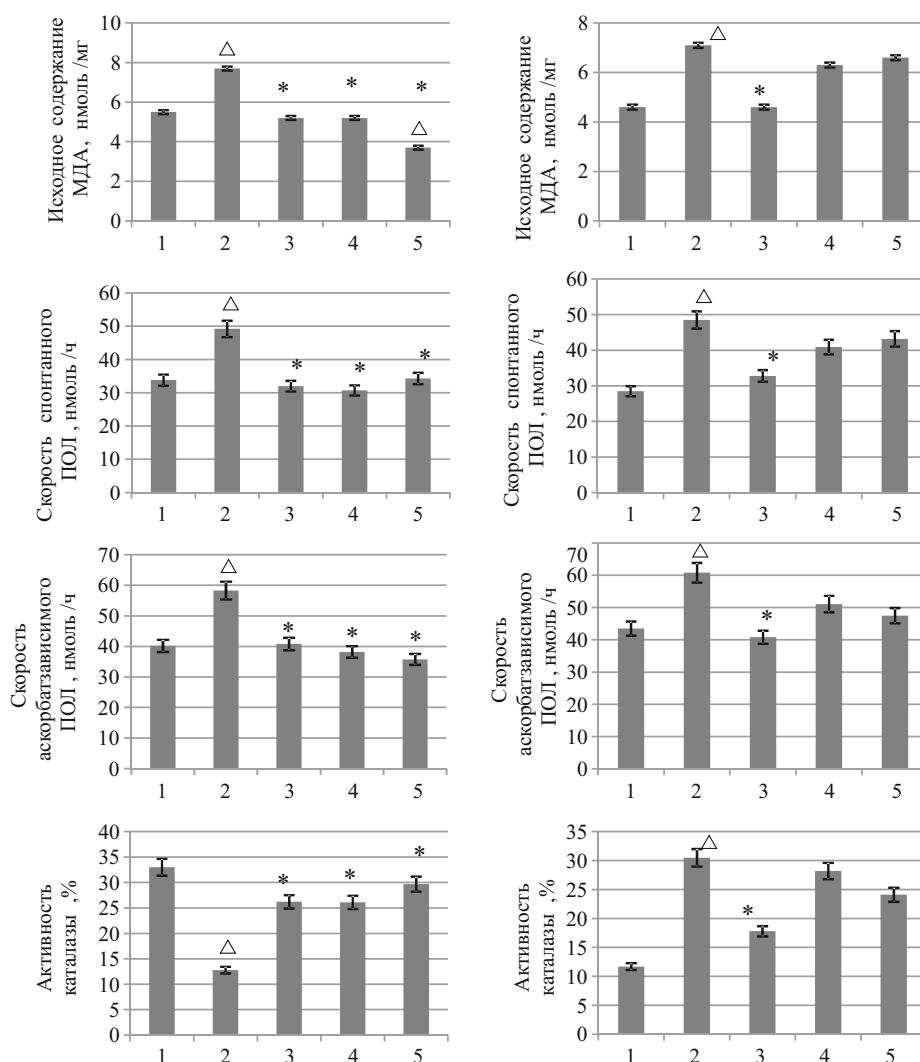


Рис. 2. Влияние фенибута, фенотропила и баклофена на процессы ПОЛ и активность каталазы в тимусе и селезенке при ЛПС-индуцированном иммунном стрессе.

1 — Контроль 1 (физр-р); 2 — контроль 2 (ЛПС); 3 — фенибут (25 мг/кг) + ЛПС; 4 — фенотропил (25 мг/кг) + ЛПС; 5 — баклофен (2 мг/кг) + ЛПС.

волны 532 нм. Расчет производили по формулам: $X_1(X_2) = (E_1(E_2) \cdot 3 \cdot 3,2 \cdot 6) / 0,156 \cdot 2$ или $X_3 = (E_3 \cdot 3 \cdot 3,2) / 0,156$, где X_1 — скорость спонтанного ПОЛ (нмоль МДА на 250 мг ткани за 1 ч инкубации); X_2 — скорость аскорбатзависимого ПОЛ (нмоль МДА за 1 ч инкубации); X_3 — исходное содержание МДА в ткани (нмоль МДА/250 мг ткани); E_1, E_2, E_3 — экстинкция проб; 3,2 — общий объем исследуемых проб; 2 — объем надосадочной жидкости, взятой на определение МДА, мл; 3 — объем проб, взятых на фотометрию, мл; 0,156 — экстинкция 1 нмоль МДА в 1 мл при 532 нм [9].

Активность каталазы в гомогенате органов определяли по методу М. А. Королюка (1988): реакция запускалась добавлением 0,1 мл гомогената тканей к 2 мл 0,03 % раствора перекиси водорода. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4 % раствора молибдата аммония. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносили 2 мл воды. Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$E = (A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}) / A_{\text{контр}} \cdot 100 \%,$$

где E — активность каталазы (%); $A_{\text{контр}}$ и $A_{\text{оп}}$ — экстинкция контрольной и опытной проб [5].

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью следующих пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США) и BIostat 2008 Professional 5.1.3.1. На первом этапе рассчитывали групповые показатели суммарной статистики — среднюю арифметическую величину (M) и ошибку средней (m), а также проводили визуализацию распределения значений с помощью частотных гистограмм. Применяли параметрический метод с определением t -критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони и Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений. Статистически значимыми расценивались эффекты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Селезенка и тимус, являясь одними из важных иммунорегуляторов гомеостаза, подвержены, как и многие другие системы организма, повреждающему воздей-

вию патогенных факторов, индуцирующих ПОЛ, в результате чего происходит образование свободных радикалов, взаимодействующих с составляющими мембран спленоцитов и тимоцитов. Так, у животных с экспериментальной иммунопатологией нами выявлены выраженные изменения ПОЛ и активности антиоксидантной системы (АОС) в иммунокомпетентных органах (рис. 1 и 2). При воздействии ЦФА происходила активация процессов липопероксидации в изучаемых иммунных органах, проявляющаяся достоверным увеличением исходного содержания МДА и кинетических показателей ПОЛ (скорости спонтанного и аскорбатзависимого ПОЛ) в гомогенате селезенки и тимуса более чем на 30 % ($p_1 < 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями в группе контрольных животных. Кроме того, наблюдалось выраженное угнетение АОС в органах, которое выражалось в снижении активности каталазы более чем на 60% по сравнению с группой иммунодепрессированных особей ($p_1 < 0,05$, рис. 1).

Установлено, что все изучаемые в работе производные ГАМК способствуют устранению формирующихся под воздействием ЦФА нарушений ПОЛ и АОС в органах иммунной системы (рис. 1). Так, под влиянием фенибута в гомогенате селезенки наблюдалось снижение скорости спонтанного и аскорбатзависимого ПОЛ и исходного содержания ТБК-активных продуктов более чем на 30 % ($p < 0,05$) по отношению к параметрам у животных, подверженных воздействию ЦФА, практически достигнув уровня контрольных значений. Фенибут также способствовал активации каталазы в селезенке, увеличивая показатель на 30 % по сравнению с группой животных с иммунодепрессией ($p < 0,05$). Однако, если сравнить интенсивность антиоксидантной защиты в селезенке с контролем 1, то следует отметить сохранение каталазной активности на невысоком уровне. При изучении влияния фенибута на биохимические реакции в гомогенате тимуса в условиях иммунодефицита выявлено, что вещество восстанавливало показатели спонтанного и индуцированного ПОЛ, а также исходного содержания МДА до фоновых значений ($p < 0,05$). Активность каталазы фенибут увеличивал по сравнению с группой животных, получавших ЦФА, не более чем на 25 % ($p < 0,05$), при этом показатель оставался на 30 % ниже по отношению к параметрам “нормы” в контроле 1 (рис. 1).

Анализ антиоксидантных свойств фенотропила в отношении иммунокомпетентных органов у животных, подверженных воздействию ЦФА, позволил установить корригирующее действие препарата на исходное содержание МДА, кинетические показатели ПОЛ в гомогенатах селезенки и тимуса: препарат практически восстановил показатели до фоновых значений в контроле 1 ($p < 0,05$, рис. 1). Следует отметить, что под влиянием фенотропила активность каталазы в гомогенате селезенки также достигала контрольных показателей у интактных животных ($p < 0,05$), тогда как в тимусе наблюдалось увеличение параметра не более чем на 40 % ($p < 0,05$), что сопровождалось сохранением более низких значений по сравнению с группой животных, получавших физиологический раствор (рис. 1).

При оценке эффективности баклофена выявлено, что вещество снижало исходный уровень МДА и скорость аскорбатзависимого ПОЛ до показателей “нормы”

($p < 0,05$) у интактных животных ($p < 0,05$), тогда как изменение скорости спонтанного ПОЛ оказалось менее выраженным — показатель был снижен не более чем на 20 % ($p < 0,05$, рис. 1). Баклофен также способствовал восстановлению активности каталазы до аналогичных значений у интактных животных ($p < 0,05$). По отношению к процессам в тимусе вещество проявило корригирующее действие, снизив исходное содержание МДА и скоростные показатели ПОЛ до значений “нормы” у интактных животных ($p < 0,05$). Следует отметить, что активность каталазы в тимусе у животных с иммунодепрессией под влиянием баклофена была выше аналогичных показателей не только в группе животных с патологией ($p < 0,05$), но и по отношению к интактным особям ($p > 0,05$, рис. 1).

Направленность изменений активности иммунной системы играет определяющую роль в интенсивности антиоксидантной защиты организма в целом и/или отдельных органов и систем. Наряду с моделью ЦФА-индуцированной иммунодепрессии в качестве одной из экспериментальных моделей иммунных нарушений мы выбрали острый иммунный стресс, считая, что полноценная оценка эффективности препарата, участвующего в процессах иммунорегуляции, невозможна без изучения его активности на противоположных по механизмам формирования моделях патологии. У животных, подверженных воздействию ЛПС, выявлена активация процессов липопероксидации в тимусе и селезенке, что проявлялось достоверно значимым увеличением исходного содержания ТБК-активных продуктов и скоростных показателей ПОЛ более чем на 40 % ($p < 0,05$, рис. 2). Интерес представляют результаты, полученные при исследовании активности каталазы в указанных органах: в селезенке наблюдалось увеличение активности данного фермента в 2,6 раза ($p < 0,05$), тогда как в тимусе, наоборот, снижение показателя в 2,5 раза ($p < 0,05$, рис. 2). Вероятно, такие изменения активности антиоксидантной системы в тимусе и селезенке обусловлены особенностями функционирования этих органов: можно предположить, что селезенка на момент проведения экспериментов (3-е сутки после ЛПС-нагрузки) находилась в состоянии функционального напряжения, тогда как тимус, через который реализуются начальные клеточные иммунные реакции на антигенный стимул — в состоянии “истощения”.

При сравнительной оценке антиоксидантной активности производных ГАМК в отношении процессов в селезенке установлено, что корригирующим действием обладал лишь фенибут, под влиянием которого наблюдалось снижение исходного содержания МДА до значений интактной группы животных ($p < 0,05$), кинетических характеристик ПОЛ — на 40 % ($p < 0,05$). Кроме того, фенибут в гомогенате селезенки восстанавливал активность каталазы, способствуя снижению показателя в 1,7 раза по сравнению с группой иммунострессированных особей ($p < 0,05$, рис. 2). В группе животных, получавших фенотропил и баклофен, значимого изменения исходного уровня МДА, кинетических параметров ПОЛ, а также активности каталазы в гомогенате селезенки не наблюдалось ($p > 0,05$, рис. 2).

Изучение влияния производных ГАМК на процессы перекисного окисления липидов в тимусе показало, что на фоне введения фенибута и фенотропила наблюдалось

снижение исходного содержания МДА и скоростных показателей ПОЛ практически на 50 % по сравнению с группой иммунострессированных животных ($p < 0,05$). Кроме того, фенибут и фенотропил способствовали активации каталазы, повышая показатель в 2 раза по отношению к группе животных, получавших ЛПС ($p < 0,05$, рис. 2).

В группе животных, получавших баклофен, отмечалось снижение скоростных показателей ПОЛ в гомогенате тимуса до значений у интактных животных ($p < 0,05$). При этом исходный уровень ТБК-активных продуктов был ниже (на 70 %) не только по сравнению с показателями животных с патологией ($p < 0,05$), но и по отношению к интактным особям (30 % при $p < 0,05$). Антиоксидантное действие препарата выражалось также в восстановлении активности каталазы практически до значений “нормы” у интактных животных ($p < 0,05$, рис. 2).

Таким образом, результаты, полученные при изучении влияния аналогов ГАМК (фенибут, фенотропил, баклофен) на процессы ПОЛ и активность каталазы в тимусе и селезенке на моделях экспериментальной патологии (циклофосфамидная иммунодепрессия и липополисахаридный иммунный стресс), подтверждают наличие у изучаемых веществ выраженных иммунорегулирующих свойств, одним из механизмов реализации которых, вероятно, является устранение нарушений перекисного окисления липидов в эффекторных органах иммунной системы.

ВЫВОДЫ

1. При циклофосфамидной иммунодепрессии наблюдается активация процессов липопероксидации в тимусе и селезенке на фоне выраженного угнетения активности каталазы. Производные ГАМК (фенибут, фенотропил и баклофен) способствуют устранению формирующихся нарушений перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в изучаемых органах иммунной системы.

2. При ЛПС-индуцированном иммунном стрессе наблюдается активация процессов перекисного окисления липидов в тимусе и селезенке при разнонаправленном изменении активности каталазы: в селезенке – увеличение, в тимусе, наоборот, подавление активности данного

фермента. В отношении биохимических процессов в селезенке корригирующим действием обладает лишь фенибут, тогда как в тимусе нормализация показателей происходит под влиянием всех изучаемых производных ГАМК (фенибут, фенотропил и баклофен).

3. Иммуномодулирующие свойства производных ГАМК (фенибут, фенотропил и баклофен) обусловлены, вероятно, способностью препаратов оказывать протективное действие на иммунокомпетентные органы, в частности тимус и селезенку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньшикова, *Окислительный стресс*, Москва (2001).
2. А. В. Караулов, *Успехи клинической иммунологии и аллергологии*, Москва (2002).
3. Г. И. Клебанов, *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.*, Приложение № 14, № 4, 109 – 118 (2002).
4. Л. В. Ковальчук, З. Ф. Хараева, Л. В. Ганковская, *Иммунология*, № 2, 86 – 89 (2003).
5. М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майрова, В. Е. Токарев, *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
6. М. А. Самотруева, А. Н. Овчарова, И. Н. Тюренков, *Вестн. новых мед. технол.*, № 3, 168 – 169 (2008).
7. М. А. Самотруева, Д. Л. Теплый, И. Н. Тюренков, *Естественные науки*, № 4, 112 – 130 (2009).
8. М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков, Д. Л. Теплый и др., *Мед. иммунол.*, № 6, 567 – 570 (2009).
9. И. Д. Стальная, Т. Д. Горишвили, *Современные методы в биохимии*, Москва (1977).
10. П. И. Толстых, Г. И. Клебанов, А. Б. Шехтер и др., *Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв*, Москва (2002).
11. А. В. Тутельян, *Автореф. дисс. д-ра мед. наук*, Москва (2004).
12. И. Н. Тюренков, Л. Е. Бородкина, А. В. Воронков, *Вестн. Волгоградского гос. мед. универ.*, № 11, 24 – 27 (2004).
13. И. Н. Тюренков, М. А. Самотруева, Н. Р. Кулешевская, Т. К. Сережникова, *Фармация*, № 4, 42 – 44 (2010).
14. И. Н. Тюренков, М. А. Самотруева, А. Н. Овчарова, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 3, 43 – 45 (2008).

Поступила 30.05.11

INFLUENCE OF GABA DERIVATIVES ON SOME INDICES OF LIPID PEROXIDATION IN IMMUNOCOMPETENT ORGANS UNDER EXPERIMENTAL IMMUNOPATHOLOGY CONDITIONS

M. A. Samotrueva¹, M. M. Magomedov¹, E. B. Khlebtsova¹, and I. N. Tyurenkov²

¹ Pharmacognosics Chair, Astrakhan State Medical Academy, Bakinskaya ul. 121, Astrakhan, 414000, Russia;

² Pharmacology and Biopharmacy Chair, Department of Postgraduate Medical Training, Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov la, Volgograd, 400131, Russia

The effects of GABA derivatives phenotropil (25 mg/kg), phenibut (25 mg/kg), and baclofen (2 mg/kg) on the process of lipid peroxidation (LPO), as manifested by the initial level of malonic dialdehyde, velocity of spontaneous and ascorbate-dependent LPO, and the catalase activity in the homogenates of thymus and spleen, have been studied on rats of the Wistar line with cyclophosphamide (CPHA) immunodepression and lipopolysaccharide (LPS) immune stress. It is established that, under the action of CPHA and LPS, activation of the LPO processes takes place in the immune organs. Under these conditions, changes of the catalase activity exhibited some specific features: in the animals under LPS action, the catalase activity increased in the spleen, while being decreased in the thymus; under the influence of CPHA, the activity of this enzyme decreased in both organs. An analysis of the antioxidant activity of GABA derivatives under the conditions of CPHA-induced immunodepression showed that all substances upon intraperitoneal introduction for 5 days favored the elimination of disturbances by suppressing the LPO processes and increasing the antioxidant protection activity. On the background of LPS-induced immune stress, all the tested substances showed a correcting action with respect to indicated biochemical processes in the thymus, while only phenibut activated the antioxidant system in the spleen.

Key words: Phenotropil, phenibut, baclofen, lipid peroxidation, catalase activity in thymus and spleen, immunodepression, immune stress